



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Permeabilidad intestinal *in vitro* de la
7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina.

TESIS

Para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA:

Marylu Adela Tinajero Iturbide



Director: Dr. Andrés Navarrete Castro
Asesor: M. en F. Martha Ugalde Hernández

México, D.F., 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna TINAJERO ITURBIDE MARYLU ADELA
con número de cuenta 305312507 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 24 del mes de Marzo de 2014 a las 13:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO
VOCAL	DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
SECRETARIO	M. en F. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
SUPLENTE	M. en C. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA
SUPLENTE	M. en F. LETICIA HUERTA FLORES

El título de la tesis que se presenta es: **Permeabilidad Intestinal *in vitro*
de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., 04 de Febrero de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ:
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.
DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q. F. B.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Q.F.B. Irma Alejandre Razo

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Suplente: M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara

Suplente: M. en F. Leticia Huerta Flores

Sitio de elaboración de la Tesis:

Laboratorio 126. Departamento de Farmacia. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Marylu Adela Tinajero Iturbide

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas, siempre estaré orgullosa de pertenecer a la mejor universidad del país

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser mi segunda casa, y por permitirme desarrollar en el ámbito académico y personal.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por brindarme la confianza para la realización de este trabajo, así como por su paciencia, ayuda y consejos durante todo este tiempo

A la M. en F. Martha Ugalde Hernández por todos los conocimientos, asesoría y apoyo proporcionado durante este periodo de titulación.

Al Dr. José Luis Balderas López por los conocimientos compartidos así como por la asesoría durante este proyecto.

A los integrantes del laboratorio 126 que colaboraron con la realización de este proyecto

Al integrante del L-126 M. en C. Alejandro Alfaro por la asesoría técnica recibida durante este proyecto.

Al proyecto PAIP 5000-9143 y PAPIIT IN203614 por los recursos proporcionados

DEDICATORIA

A mis padres Alejandro y Florina, por su apoyo, amor y cariño incondicional, gracias a ellos he logrado alcanzar todas mis metas, ya que me dieron las armas necesarias para poder vencer cualquier obstáculo. Es un orgullo poder decir que soy su hija, los amo.

A mi hermano Alejandro por todas sus enseñanzas, paciencia y apoyo, gracias a él pude realizar esta meta. Siempre será mi ejemplo a seguir y mi orgullo.

A mi hermana Flor por demostrarme que con esfuerzo y dedicación cualquier sueño puede ser posible y por la dicha de ser tía de mi pequeño Luis. Gracias a los dos por creer en mí, los amo.

Agradezco a todos mis familiares por creer en mí, especialmente a mis tíos Daniel y Esperanza que siempre han estado para apoyarme.

A Juan Carlos, mi compañero, mi mejor amigo, siempre ha estado a mi lado apoyándome en todo, gracias por confiar en mí y por todos los momentos que hemos pasado juntos y por tu cariño incondicional, te amo.

Finalmente a mis amigos: Carolina, Beatriz, David, Jesús, Carlos, Gerardo, Luis Ángel, Marilú y Patricia por todos los lindos momentos que compartimos, ustedes son una parte muy importante en mi vida.

CONTENIDO

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
1. MARCO TEÓRICO.....	9
1.1 Absorción y permeabilidad de los fármacos	9
1.2 Anatomía y fisiología del intestino delgado	11
1.3 Glicoproteína P	13
1.4 Métodos empleados en la evaluación de la permeabilidad y absorción intestinal	13
1.4.1 Líneas celulares CaCo-2	14
1.4.2 Sistemas PAMPA.....	14
1.4.3 Métodos <i>in vitro</i> (basados en tejidos animales)	15
1.4.4 Método del intestino invertido	15
1.4.5 Transporte a través del segmento intestinal (de lado a lado de la cámara de Ussing).....	16
1.4.6 Modelo de saco intestinal	17
1.5 <i>Heterotheca inuloides</i>	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 General	23
3.2 Particulares.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODO	25
5.1 Sustancias	26
5.2 Equipo	27
5.3 Animales	27
5.4 Preparación de solución Krebs- Henseleit (KHS)	28
5.5 Preparación de la suspensión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	28
5.6 Experimentación <i>in vitro</i>	28
5.6 Preparación de las muestras.....	31
5.7 Experimentación con Verapamilo	31

5.8 Análisis de las muestras	31
5.9 Validación del método bioanalítico	32
5.9.1 Matriz biológica.....	32
5.9.2 Selectividad.....	32
5.9.3 Adecuabilidad	32
5.9.4 Linealidad	33
5.9.4.1 Prueba de Homoscedasticidad.....	33
5.9.5 Precisión y Porcentaje de recobro	34
5.9.6 Exactitud	34
5.9.7 Estabilidad.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Purificación e identificación de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina	35
6.2 Validación del método bioanalítico	36
6.2.1 Selectividad.....	36
6.2.2 Linealidad	37
6.2.2.1 Prueba de homoscedasticidad	37
6.4 Saturación de la permeabilidad.....	42
6.5 Experimentación con Verapamilo	44
7. DISCUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONES.....	48
9. PERSPECTIVAS	49
10. REFERENCIAS	50
11. ANEXOS	54
Anexo 1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	54
Anexo 2. Prueba de homoscedasticidad.....	56
Anexo 3. Validación del método	59

RESUMEN

En este trabajo se determinó la permeabilidad *in vitro* de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina aislada del *Árnica Mexicana* (*Heterotheca inuloides*) utilizando el modelo de intestino de cobayo. En los tres segmentos de intestino delgado se encontró que la permeabilidad se ajusta a una cinética de primer orden, presentándose en el yeyuno el mejor perfil cinético. Para determinar si existe saturación en la permeabilidad se trabajó con diferentes concentraciones de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (0.625, 1.25 y 2.5 mg/mL dentro de cada segmento intestinal) determinándose que no existe saturación de la membrana con estas concentraciones, ya que, el área bajo la curva de cada concentración sigue un comportamiento lineal ($r=0.983$). Finalmente se estableció que en el proceso de transporte de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina no interviene la glicoproteína P, para ello se utilizó clorhidrato de verapamilo como inhibidor. Los resultados obtenidos indican que la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina atraviesa la membrana intestinal, sin la intervención de la glicoproteína P, esperándose que esta sustancia se absorba adecuadamente por vía oral.

INTRODUCCIÓN

Heterotheca inuloides, comúnmente conocida como Árnica Mexicana, es una planta que se utiliza en la medicina tradicional mexicana en forma tópica en el tratamiento de hematomas y heridas en la piel. También se utiliza en forma de infusiones y macerados para tratar el dolor inflamatorio. ¹

De esta planta se han aislado distintos tipos de compuestos entre los que se encuentran algunos flavonoides y sesquiterpenoides como la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina ². A esta sustancia se le ha determinado actividad antiinflamatoria y efecto antinociceptivo, después de administrarla de forma tópica y sistémica ^{2,3}. En el presente trabajo se describen los resultados del estudio de permeabilidad *in vitro* en intestino de cobayo de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, como una primera aproximación para conocer sus propiedades de absorción.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Absorción y permeabilidad de los fármacos

La absorción es el proceso mediante el cual las moléculas del fármaco alcanzan la circulación sanguínea, es decir, que el fármaco pasa a través de una barrera fisiológica: la membrana plasmática. ⁴

Las membranas plasmáticas son bicapas lipídicas que comprenden distintos fosfolípidos anfipáticos (ejemplo: esfingomielina, fosfatidilcolina), colesterol, glucolípidos y proteínas (incluyendo a los transportadores), que forman barreras hidrofóbicas delgadas de aproximadamente 5 nm. ⁵

La bicapa lipídica es semipermeable, es decir, algunas moléculas difunden a través de ella, es relativamente impermeable a moléculas pequeñas cargadas como los iones y muy permeable a moléculas liposolubles. ⁵

La permeabilidad de los fármacos a través de la membrana intestinal es un proceso complejo y dinámico, incluye el paso de compuestos a través de distintas vías funcionales (**Figura 1**). ⁶

- **El transporte pasivo**, ocurre a través de la membrana celular de los enterocitos (transcelular) o a través de sus uniones estrechas (paracelular) y es la ruta más común para el transporte de fármacos lipofílicos de bajo peso molecular. ^{6, 7, 8}.

Los compuestos polares o hidrófilos tienden a ser transportados por la ruta paracelular, pero esta vía se limita a moléculas de menos de 200 Da a causa de las uniones estrechas entre las células y debido a que la mayoría de los compuestos son más grandes que estas uniones toman como principal vía de transporte la ruta transcelular. Se ha sugerido que las moléculas que se

transportan por la ruta paracelular tienen características de baja absorción, mientras que las que utilizan rutas transcelulares tienen buenas características de absorción.⁷

- **Transporte mediado por moléculas transportadoras.** En este proceso de transporte interviene una proteína transportadora. Es un mecanismo saturable e implica la interacción específica entre la molécula y el transportador y es utilizado por pequeñas moléculas hidrófilas.⁵

Existen dos tipos de transporte mediado por transportador: activo y pasivo. El transporte activo requiere energía y puede actuar en contra de un gradiente de concentración. Por otro lado, el transporte pasivo no requiere energía, por lo tanto actúa de acuerdo al gradiente de concentración.⁸

Existen más 400 transportadores de membrana que pertenecen a dos superfamilias: la familia ABC (ATP binding cassette) y la familia Transportadora de Solutos (SLC por sus siglas en inglés).

La familia de transportadores ABC requiere la unión y la hidrólisis de ATP para funcionar y mediar el proceso de transporte activo. Muchos transportadores de recaptación de la familia SLC son impulsados por gradientes iónicos creados por los transportadores dependientes de ATP, tales como la Na / K ATPasa.^{5, 8, 9}

Los mecanismos de absorción dependen de las características fisiológicas gastrointestinales, del pH y de la motilidad intestinal.¹⁰

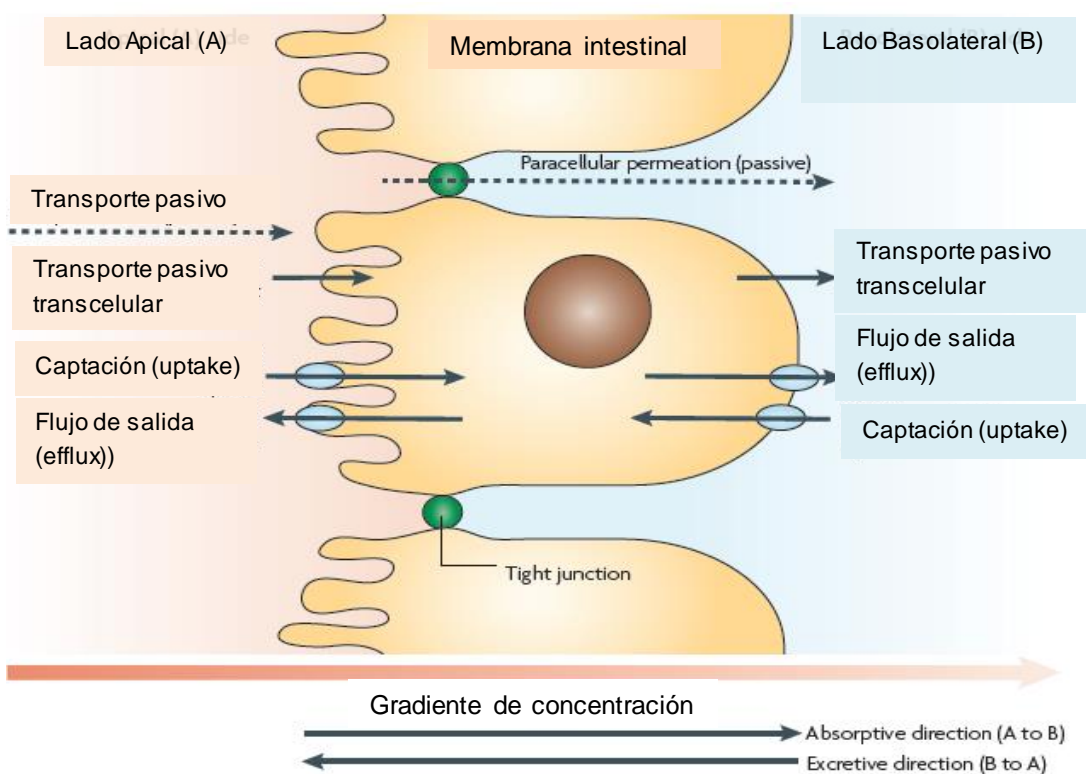


Figura 1. Representación de la estructura de la membrana intestinal que muestra las diferentes vías de transporte del fármaco. La vía transcelular es la ruta que pasa a través de las células epiteliales (vía transcelular pasiva y mediada por transportadores). La permeabilidad paracelular es la ruta que pasa entre las células. La captación (uptake) se refiere al transporte hacia el interior de la célula, mientras que el flujo de salida (efflux) transporte hacia fuera de la célula (Figura tomada de Sugano y colaboradores.)⁵

1.2 Anatomía y fisiología del intestino delgado

El intestino delgado del ser humano mide aproximadamente entre 2 y 6 metros, está dividido en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon, que comprenden el 5%, 50%, y 45% de longitud, respectivamente. Aproximadamente el 90% de toda la absorción en el tracto gastrointestinal se produce en el intestino delgado.⁶

El intestino delgado tiene pliegues circulares, vellosidades y microvellosidades que aumentan el área de superficie para la absorción de distintas sustancias. Las vellosidades aumentan el área de superficie 30 veces, mientras que las microvellosidades la aumentan por un factor de 600 (**Cuadro 1**).⁶

Cuadro 1. Parámetros biológicos y físicos del tracto intestinal humano				
Segmento gastrointestinal	Área de superficie	Longitud del segmento (cm)	Tiempo de residencia	pH de cada segmento
Cavidad oral	100cm ²	--	Segundos a minutos	6.5-7.0
Esófago	200cm ²	23-25	Segundos	--
Estomago	3.5m ²	0.25	1.5h	1-2
Duodeno	1.9m ²	35	0.5-0.75h	4.0-5.5
Yeyuno	184m ²	280	1.5-2.0h	5.5-7.0
Íleon	276m ²	420	5-7 h	--
Colon y recto	1.3m ²	150	1-60 h (promedio 30 h)	7.0-7.5

Las células epiteliales más comunes son los enterocitos, estas células son las responsables de la absorción de los nutrientes y fármacos.⁶

La absorción en la región apical o serosa del enterocito es regulado por proteínas transportadoras como MDR1 (Glicoproteína P), ASBT (Transportador Apical de Sales Biliares de Sodio), OATPs (Proteínas Transportadoras de Aniones Orgánicos), 1-Pept (Transportador de péptidos 1), entre otras. Estas proteínas están implicadas en el transporte de muchos compuestos fisiológicos, incluyendo aminoácidos, aniones y cationes orgánicos, así como una gran variedad de fármacos tales como β lactámicos, inhibidores de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina), bifosfonatos, metotrexato, etc.¹¹

1.3 Glicoproteína P

Pocas moléculas pueden atravesar la membrana celular sin ayuda de proteínas especializadas. Estas proteínas de transporte son de gran importancia farmacológica debido a que participan en la distribución, acción y eliminación de los fármacos. La glicoproteína P pertenece a la familia de los transportadores ABC (ATP binding cassette) que posibilitan el transporte activo de sustancias desde el interior de las células funcionalmente polarizadas hacia el espacio extracelular (transportadores de eflujo), estas proteínas transportadoras poseen los denominados cassettes de unión al ATP, que son dominios proteicos que utilizan ATP como portador de energía para los procesos de transporte. La glicoproteína P en el ribete en cepillo del epitelio intestinal participa en la eliminación de fármacos y reduce la biodisponibilidad de la digoxina^{5, 12}. En la cara luminal de las células endoteliales de los capilares cerebrales, la glicoproteína P transporta medicamentos hacia el compartimento sanguíneo y limita de esta manera el ingreso de dichas sustancias al sistema nervioso. Numerosas interacciones farmacológicas se producen por modulación de la glicoproteína P y los transportadores ABC. Los inhibidores de la glicoproteína P, como el itraconazol o la atorvastatina, pueden aumentar la biodisponibilidad de los fármacos transportados. Los inductores, como por ejemplo, la rifampicina o hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) inducen la expresión de la glicoproteína P y de otras proteínas de biotransformación.¹²

1.4 Métodos empleados en la evaluación de la permeabilidad y absorción intestinal

Los métodos comúnmente utilizados para estudiar la permeabilidad celular, así como la absorción intestinal de los fármacos son: *in vivo*, *in situ* e *in vitro*^{13, 14}. A continuación se describen los estudios de permeabilidad *in vitro* más utilizados:

1.4.1 Líneas celulares CaCo-2

En los últimos años el uso de líneas celulares del epitelio intestinal, tales como las CaCo-2, se ha incrementado drásticamente en muchos campos de la investigación⁶. Esta línea celular derivada del adenocarcinoma de colon humano, es utilizada ampliamente para modelar la permeabilidad de diferentes fármacos que llegan al intestino humano después de la administración oral¹¹.

Estas células se cultivan en un filtro (que sirve como soporte) de múltiples pocillos y la permeabilidad se mide por el movimiento de las moléculas de un lado de la monocapa celular a otro, estas monocapas simulan las características del intestino delgado, ya que, cuentan con uniones estrechas entre las células, microvellosidades y transportadores de membrana como la glicoproteína P.^{7,8}

1.4.2 Sistemas PAMPA

Los ensayos de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA, Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) fueron introducidos en 1998 para predecir la permeabilidad *in vivo*. Desde entonces han ido ganando un interés considerable en la industria farmacéutica. Este método utiliza una capa de fosfolípidos sobre un filtro que actúa como soporte, de modo que se distinguen dos compartimentos acuosos, que permiten mimetizar la situación en la que se produce la difusión pasiva de moléculas pequeñas, no complicada por mecanismos activos. Debido a su bajo costo y versatilidad, es un complemento particularmente útil a los modelos de permeabilidad celular, tales como el modelo de células CaCo-2.¹³

1.4.3 Métodos *in vitro* (basados en tejidos animales)

Es difícil obtener tejidos humanos viables para realizar estudios de permeabilidad. Dado que el tejido intestinal de animales se compone esencialmente del mismo tipo de células endoteliales que el de los seres humanos, es posible utilizar algunas especies animales para realizar los estudios de permeabilidad de diferentes fármacos.⁶

Los modelos con tejidos extirpados de animales se han utilizado desde la década de 1950 para estudiar el mecanismo de la absorción de nutrientes del intestino. La evidencia sobre la captación de glucosa en contra de un gradiente de concentración proporciona un marcador para estudios mecánicos en los tejidos extirpados de intestino de animales. Sin embargo, la viabilidad de los tejidos extirpados es difícil de mantener ya que los tejidos están desprovistos de suministro directo de sangre y de oxigenación constante.⁶

1.4.4 Método del intestino invertido

La técnica intestino invertido fue utilizada desde la década de 1950 en el estudio de transporte de azúcares y aminoácidos de la mucosa a lado seroso. La región intestinal de interés se incubaba en medios salinos que contienen glucosa y aminoácidos. El espacio seroso se analiza para determinar los azúcares¹⁵. Se han hecho modificaciones tales como oxigenación constante de las soluciones fisiológicas durante la etapa de incubación y agitación suave, que han aumentado la viabilidad de los tejidos. Este modelo es ideal para estudiar el mecanismo de absorción de los fármacos ya que puede ser estudiado tanto el transporte pasivo y activo.¹⁵

1.4.5 Transporte a través del segmento intestinal (de lado a lado de la cámara de Ussing)

Los estudios de transporte a través de segmentos intestinales de los animales es también un método ampliamente utilizado para estudiar la permeabilidad de fármacos. Este método implica el aislamiento del tejido intestinal, se corta en fragmentos de tamaño apropiado, se coloca en un dispositivo adecuado y se mide la velocidad de transporte del fármaco a través de este tejido. En este método, la permeabilidad se mide con la obtención del fármaco en el lado seroso en lugar de la desaparición de fármaco en el lado de la mucosa. La característica única de este enfoque es que la resistencia eléctrica de la membrana se puede medir durante el curso del experimento. La corriente de corto-circuito a través de la membrana, así como la resistencia a través de la membrana, se puede supervisar. Estos parámetros se utilizan habitualmente como un indicador de la viabilidad del tejido intestinal durante los estudios de transporte con cámara de Ussing. El coeficiente de permeabilidad aparente (P) se calcula utilizando la ecuación. ¹⁶

$$P = \left(\frac{V}{A * C_o} \right) \left(\frac{dC}{dT} \right)$$

Donde V es el volumen de la cámara receptora, A es el área de la superficie del tejido expuesto, Co es la concentración de fármaco inicial en la cámara donante, y dC /dT es el cambio en la concentración del fármaco en el receptor con el tiempo. La técnica de la cámara Ussing es un método ideal para estudiar las diferencias regionales en la absorción de fármacos mediante el montaje de los tejidos intestinales de diferentes regiones. También es posible llevar a cabo estudios con tejidos intestinales humanos proporcionando así una metodología para comparar los valores de permeabilidad a través de especies. Las cantidades de fármaco necesarias para el estudio son relativamente pequeñas (miligramos) y las muestras recogidas se tratan para facilitar el análisis cuantitativo. Aparte de las desventajas asociadas comúnmente con los estudios *in vitro*, los inconvenientes de esta técnica son la falta de suministro de sangre, la rápida pérdida de viabilidad

de los tejidos durante el experimento, cambios en la morfología y la funcionalidad de las proteínas de transporte durante el proceso de la cirugía y montaje de los tejidos.⁶

1.4.6 Modelo de saco intestinal

El modelo de saco formado con intestino de animales inferiores (ratones, ratas, cobayos, etc.) es un modelo *in vitro* de fácil preparación, reproducible y que no requiere del uso de aparatos inusuales¹⁵, sin embargo, la viabilidad de los tejidos es de pocas horas, en algunos experimentos se ha determinado de aproximadamente 120 minutos.

El empleo del saco no invertido fue diseñado originalmente para evaluar los mecanismos de transporte, permite estudiar la permeabilidad pasiva de las moléculas transportadas activamente y se pueden estudiar dos fármacos simultáneamente. En ese modelo, la preparación de los sacos es más sencilla que cuando se requiere invertir el tejido y se evitan posibles daños morfológicos: las cantidades de fármaco que se requieren para el estudio son relativamente pequeñas y se pueden tomar muestras analíticamente limpias con frecuencia y en forma sucesiva.¹¹

Los métodos *in vitro* son utilizados para estudiar la permeabilidad celular así como la absorción intestinal de los fármacos, por tal motivo, también pueden ser empleados para determinar la absorción que tienen ciertas sustancias que se encuentran en las plantas medicinales, sabiendo que, algunas de estas plantas son administradas por vía oral.^{6, 11}

1.5 *Heterotheca inuloides*

Heterotheca inuloides Cass (Asteraceae), es una planta que crece abundantemente en las regiones frías y templadas de México ¹⁷ y llega a medir hasta un metro de altura ³. En ocasiones las hojas son más largas que anchas. Las flores están agrupadas en una cabezuela con cerca de 150 pétalos, todas colocadas en un disco, parecidas a las margaritas; las brácteas que rodean la cabezuela están ordenadas de mayor a menor y son velludas como el tallo (Figura 2). ¹



Figura 2. *Heterotheca inuloides* Cass. Fotografías cortesía del Dr. Andrés Navarrete Castro (diciembre, 2010)

Otros nombres con los que se le conoce al árnica mexicana son: árnica de campo, árnica de monte, árnica del país, cuateteco, cuateteco, falsa árnica, hornilla, tabaco de las montañas. ³

Existe gran cantidad de información acerca del uso tradicional de esta planta en el tratamiento de heridas, en las cuales se colocan las hojas como emplasto o

cataplasma o con el cocimiento de las flores se hacen lavados y se aplican fomentos ¹. En ocasiones la decocción se hace junto con ramas de gordolobo, en este caso, además de realizar el lavado se colocan las hojas cocidas sobre las heridas, además de administrar al paciente un Mejoral®, esta curación se realiza durante tres días. En caso de golpes y contusiones, en los que hay dolor, se utiliza en forma de té, como macerado o en forma de pomada elaborada con la planta molida con manteca. Se utiliza también como analgésico en casos de: dolor de úlcera de estómago o de la boca del estómago, pulmonía, dolor de pecho, muscular y renal; se toma la infusión de la planta como agua de tiempo, o se emplea en fomentos calientes si se padece dolor de muelas. Para problemas gastrointestinales como gastritis o úlceras, se toma el cocimiento, ya sea en ayunas o después de cada alimento. Se menciona que también es útil para administrar a los niños que se orinan en la cama, en padecimientos de los riñones, e irritación de la vejiga, contra el cáncer y para los nervios.^{1,3, 17,18}

El árnica mexicana es utilizada en el tratamiento tópico de contusiones, hematomas, heridas de la piel y lesiones ¹⁸, además actúa como antioxidante por su actividad inhibidora contra la peroxidación lipídica y la hemólisis oxidativa.¹⁹

La flor es el órgano más estudiado de *Heterotheca inuloides* ¹⁷, se han identificado algunos sesquiterpenoides, además de que se han aislado distintos flavonoides (**Cuadro 2**).¹⁹

Se han realizado investigaciones en donde se estableció que el sesquiterpenoide 7- hidroxi-3,4 dihidrocadalina (**Figura 3**) extraído del árnica mexicana presenta una potente actividad antibacteriana, contra bacterias Gram positivas y actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina. ²

Cuadro 2. Metabolitos secundarios presentes en <i>Heterotheca inuloides</i> ^{3, 17, 18, 19}		
Extracto	Composición	Actividad
<i>Heterotheca inuloides</i> Extracto acetónico	Ácido cadalen-15-óico, 3,7-dihidro-3(4H)-isocadalen-4-ona, dicadalenol, 7-hidroxicadalenol, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina, 1 α , hidroxil-1(4H)-isocadalen-4-ona, Ácido 1 α -hidroxil-4 α H-1,2,3,4- tetrahidrocadalen-15-óico, β -sitosterol	Antiinflamatorio Inhibición de la COX-1 y COX-2 Antioxidante Inhibición de la peroxidación lipídica
<i>Heterotheca inuloides</i> Extracto metanólico	Quercetina, 3-O-glucósido de quercetina, Kampferol, 3-O-glucósido campferol, Kampferol-O-soforósido, D-quirositol, Espinasterol, Glucósido 3-O- β -D-epinasterol, 7-hidroxi -3,4-dihidrocadalina, 7-hidroxicadalenol	Inhibición de la actividad de la tirosinasa Antioxidante Inhibición de la peroxidación lipídica Antiinflamatorio
<i>Heterotheca inuloides</i> Extracto hexánico	Óxido de cariofileno, Cedreno 7-hidroxicadalenol 7-hidroxi -3,4-dihidrocadalina	Antinociceptivo

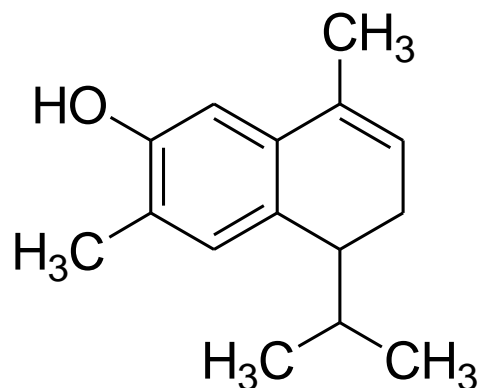


Figura 3. Estructura de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

Los sesquiterpenoides, 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina y 7-hidroxicajalina, y algunos flavonoides y sus glucósidos aislados muestran una potente actividad antioxidante, en el modelo *in vitro* de difenil-p-picrilhidracilo (DPPH). Estos sesquiterpenoides inhiben la peroxidación microsomal de los lípidos inducida por Fe (III) - ADP/NADPH. Esto contribuye a la protección de los tejidos contra diversas tensiones oxidativas.¹⁹

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina también posee efecto antinociceptivo en la nocicepción de tipo somático inflamatorio por medio de la activación de receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}).³

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Heterotheca inuloides es una de las especies de nuestro país más utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de contusiones, hematomas, heridas de la piel y lesiones ¹⁸. Uno de los sesquiterpenoides aislados de esta planta es la 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalina la cual inhibe a la peroxidación microsomal de los lípidos, lo que se correlaciona con su actividad antiinflamatoria ², además de tener un efecto antinociceptivo en el dolor de tipo somático inflamatorio. ³

Esta planta es utilizada también en forma de infusiones y macerados, que se administran por vía oral, por lo que es importante determinar la permeabilidad intestinal de la 7-hidroxi-3,4 dihidrocadalina para conocer, por un lado el sitio del intestino en el que mejor se absorbe, y por otro conocer qué tipo de cinética sigue en el sitio de absorción, con el propósito de estimar de qué forma se absorbe en el intestino cuando se administra por vía oral.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Determinar la permeabilidad *in vitro* de la 7-hidroxi-3,4-dihidroscadalina aislada del árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) utilizando el modelo de saco intestinal en intestino delgado de cobayo

3.2 Particulares

- Determinar la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidroscadalina en los tres segmentos de intestino delgado de cobayo.
- Determinar el modelo farmacocinético al que mejor se ajusta la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidroscadalina en intestino delgado de cobayo.
- Desarrollar y validar el método bioanalítico para cuantificar a la 7-hidroxi-3,4-dihidroscadalina en el lumen intestinal de cobayo.
- Determinar la participación de la glicoproteína P en el transporte de la 7-hidroxi-3,4-dihidroscadalina, inhibiéndola con clorhidrato de verapamilo.

4. HIPÓTESIS

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es un sesquiterpenoide de bajo peso molecular soluble en disolventes de baja polaridad, por lo que se espera que sea permeable en la membrana intestinal de cobayo por proceso de difusión simple, siguiendo una cinética de orden cero y que el duodeno sea el segmento en el que la permeabilidad ocurra con mayor velocidad, ya que este es la parte donde se absorben la mayoría de las sustancias que se administran por vía oral.

5. MATERIAL Y MÉTODO

En la **Figura 4** se observa el esquema general de la metodología

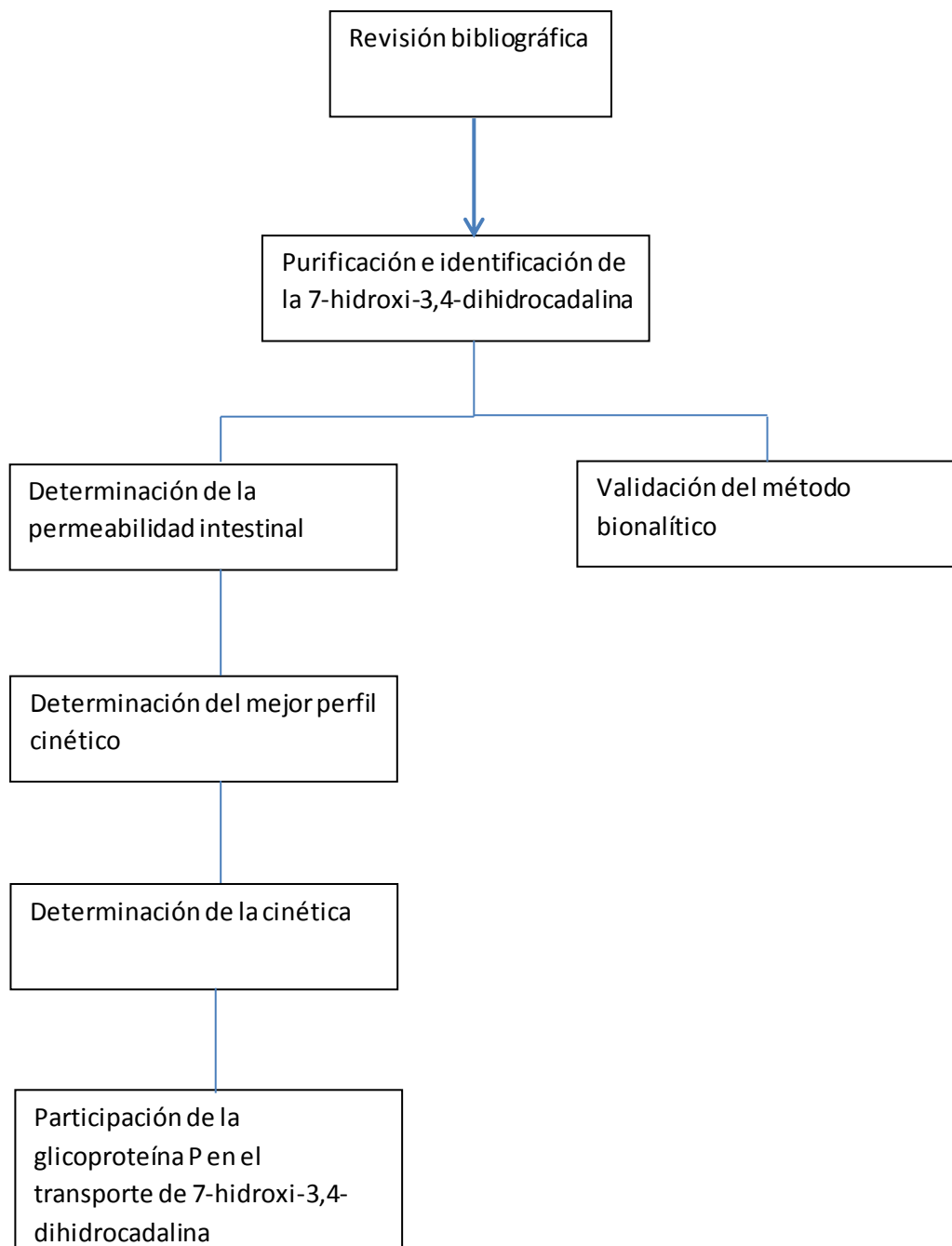


Figura 4. Esquema general de la metodología

5.1 Sustancias

La 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina se aisló a partir de las inflorescencias de *Heterotheca inuloides* donadas por Laboratorios Mixim y recolectadas en Mesas Altas, Municipio de San Juan Xoconusco Estado de México, siguiendo la metodología descrita en estudios previos del Laboratorio 126 de la Facultad de Química³. Se purificó por recristalización con hexano. Para corroborar la pureza del compuesto se realizó un monitoreo por cromatografía en capa fina y por cromatografía de líquidos, se caracterizó e identificó por métodos espectroscópicos y espectrométricos comparándolo con los descritos en la literatura^{21, 22}.

Para los análisis de todas las muestras obtenidas se utilizó metanol y acetonitrilo de grado HPLC adquiridos de Merck-Millipore (México D.F.).

Para preparar 4 L de solución Krebs- Henseleit (KHS) se utilizaron las siguientes sales:

NaCl (27.6 g), KCl (1.4 g), MgSO₄•7H₂O (1.18 g), NaH₂PO₄ (0.66 g), NaHCO₃ (8.4 g), D- glucosa (7.9 g), EDTA (0.068 g) y CaCl₂•H₂O (1.47 g), grado reactivo adquiridos de J.T. Baker.

Para la elaboración de la suspensión de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina se utilizó Polisorbato 20 como surfactante en trazas.

Se utilizó pentobarbital sódico (6.3 g/100mL) como solución de uso veterinario (Anestesa® Pfizer), para el sacrificio de los animales.

Para preparar una solución 10 mM de Verapamilo se utilizó clorhidrato de Verapamilo grado farmacéutico donado por HELM de México, S.A. de C.V.

5.2 Equipo

El sistema cromatográfico consistió de una bomba Waters Delta 600 (Waters Corp., Milford, MA, USA), un inyector Waters 717 Plus, un controlador automático de gradientes 600, un detector UV con arreglo de fotodiodos Waters 2996 y una estación computarizada para procesamiento de datos equipada con el software Waters Empower.

Equipo Fisher Johns marca Fisher Scientific que cuenta con un termómetro de 0° a 300°C para la determinación del punto de fusión.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN ¹H y RMN-¹³C se obtuvieron con un espectrómetro Varian Modelo Unity INOVA 300 de 400 MHz

El espectro de masas se determinó con un Espectrómetro marca Thermo-Electron modelo DFS (Double Focus Sector) y analizador de masas doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa); se utilizó una Sonda para introducción directa (ID) con una velocidad de calentamiento de 100°C/min y bombardeo con iones de Cesio (FAB) con un detector de iones positivos.

5.3 Animales

Los experimentos se realizaron en intestino de cobayos macho con un peso entre 350 y 450 gramos, los animales se adquirieron de la empresa Biosupply, S.A. de C.V., tuvieron libre acceso a comida y agua potable antes de los experimentos. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidados y uso de los animales de laboratorio.

Inicialmente estos experimentos también se realizaron en intestino de ratas macho Wistar con un peso entre 250-300 gramos (estos resultados se mencionan en la discusión).

5.4 Preparación de solución Krebs- Henseleit (KHS)

Se disolvieron las sales (excepto el cloruro de calcio) en 3 L de agua destilada, una vez disueltas se adiciono el $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y se aforo a 4 L con agua destilada.

5.5 Preparación de la suspensión de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

Se pesaron 25 mg de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, se adicionó 1 gota de polisorbato 20 para humectar los cristales, se aforó a 5 mL con solución KHS, y se sonicó hasta formar la suspensión.

5.6 Experimentación *in vitro*

Se utilizaron cobayos macho, los animales se sacrificaron con pentobarbital sódico administrado por vía intraperitoneal (por sobredosis), inmediatamente después se abrió la cavidad abdominal y se diseco el intestino delgado, enseguida se lavó con solución KHS. El intestino se cortó en segmentos de 15 cm, los cuales se cerraron con hilo al cual previamente se le ató una pesa de 3.1 g y el otro extremo se conectó al tubo central **a** de una cámara diseñada para estudios de absorción *in vitro* (**Figura 5**), cada cámara se llenó con el mismo volumen de solución KHS y se mantuvo a una temperatura constante de 37°C. El tubo **b** (**Figura 5**) sirve para oxigenar el tejido. A cada segmento de intestino se le administró 1.5 mL de solución KHS para después administrar 0.5 mL de suspensión de 7-hidroxi-3,4 dihidrocajalina (5mg/mL). La concentración en cada segmento fue de 1.25 mg/mL. También se determinó la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina a las concentraciones de 0.625 mg/mL y 2.5 mg/mL en cada segmento de intestino, para determinar la linealidad de la permeabilidad. Se tomaron muestras

de 0.2 mL del interior del intestino con remplazo de volumen a través de una cánula **h** (**Figura 5**) cada 10 minutos durante un periodo de 120 minutos. Cada experimento se repitió 10 veces.

5.6 Preparación de las muestras

A cada una de las muestras tomadas del intestino (0.2mL) se les adicionó 0.8 mL de metanol grado HPLC, posteriormente se centrifugaron durante 12 minutos a 11000 rpm, del sobrenadante se tomaron 0.5 mL, se filtraron con filtros de nylon de 0,45 μm y se llevaron a 1 mL de volumen con metanol grado HPLC.

La cantidad de 7-hidroxi-3,4-dihidroscopolina en cada una de las muestras se analizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

5.7 Experimentación con Verapamilo

Se preparó una solución 10 mM de Verapamilo.

Se siguió la misma metodología que en el punto 5.5, con la siguiente modificación: A cada segmento de intestino se le administró 1.0 mL de solución KHS para después administrar 0.5 mL de la solución 10 mM de Verapamilo, después de 15 minutos se administraron 0.5 mL de la suspensión de 7-hidroxi-3,4-dihidroscopolina (5mg/mL). La concentración de 7-hidroxi-3,4-dihidroscopolina en cada segmento fue de 1.25 mg/mL. Se tomaron muestras de 0.2 mL del interior del intestino con reemplazo de volumen a través de una cánula **h (Figura 3)** cada 10 minutos durante un periodo de 120 minutos. La preparación de las muestras se siguió como se indica en el punto 5.6.

5.8 Análisis de las muestras

Para el análisis de las muestras se utilizó el método nombrado como “Scopolina” bajo las siguientes condiciones:

Velocidad de Flujo: 1mL/min

Volumen de inyección de la muestra: 10 μL /min

Temperatura: 30°C

Tiempo de corrida: 6 min

Longitud de onda: 220 nm

Columna: Luna C18 150mm x 4.6mm con tamaño de partícula de 5µm

Fase móvil: Acetonitrilo grado HPLC

Los datos obtenidos como áreas bajo la curva se transformaron a concentraciones mediante la ecuación resultante de la validación del método, posteriormente se realizaron las gráficas concentración vs tiempo para comparar cada segmento de intestino. Con el coeficiente de correlación (r^2) de cada curva se determinó el modelo al que mejor se ajusta la cinética, y con la ecuación se obtuvo la constante para cada segmento de intestino.

5.9 Validación del método bioanalítico

5.9.1 Matriz biológica

Se lavó el intestino delgado con solución KHS, cada segmento de 15 cm de largo contenía 2 mL de solución KHS, permanecieron durante 2 h en un baño recirculado a temperatura constante de 37°C, ese contenido fue la matriz biológica utilizada.^{23, 24}

5.9.2 Selectividad

Se analizaron 6 matrices obtenidas de diferentes animales y se compararon con muestras de matriz cargada a la concentración de 30 µg/mL.^{23, 25}

5.9.3 Adecuabilidad

Se inyectó por quintuplicado matrices cargadas con la concentración de 100 µg/mL. Se determinó el coeficiente de variación (CV), y para cada inyección se determinó el factor de capacidad (k'), y el factor de asimetría (t) obtenidos directamente del software Empower.

5.9.4 Linealidad

Se construyó una curva con matrices cargadas con las siguientes concentraciones: 3, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 µg/mL (cada curva se realizó por triplicado), dichas concentraciones corresponden a cada uno de los niveles de la curva.

5.9.4.1 Prueba de Homoscedasticidad

Para obtener la curva de calibración más adecuada se realizó la prueba de homoscedasticidad.²⁶

Se calculó la varianza del nivel de concentración menor (S_1^2) y la varianza del nivel de concentración mayor (S_2^2) de la curva. Posteriormente se determinó el valor de F por medio de la siguiente expresión:

$$F_{exp} \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

La F experimental (F_{exp}) obtenida se comparó con la F de tablas con un nivel de significancia del 99%

Se calculó el valor de los residuales por medio de la siguiente expresión:

$$\text{Residual} = (y_{observada} - y_{predicha})$$

Se construyó la gráfica de residuales vs concentración para determinar si la distribución de los valores obtenidos está por arriba y por debajo de la media.²⁶

Para obtener la mejor curva se calculó la sumatoria del porcentaje de error relativo (%RE) de los modelos de calibración propuestos por Almeida y colaboradores, utilizando la siguiente expresión.²⁶

$$\%RE = \frac{\text{Concentración}_{obtenida} - \text{Concentración}_{nominal}}{\text{Concentración}_{nominal}} \times 100$$

Una vez que se determinó cuál es la mejor curva, se realizó la gráfica de cantidad adicionada vs cantidad recuperada, se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación.^{23, 24, 25}

5.9.5 Precisión y Porcentaje de recobro

Se analizaron las matrices cargadas con las siguientes concentraciones 20, 100 y 200 µg/mL, cada nivel se realizó por quintuplicado (se realizaron en dos distintos días).^{23, 25}

5.9.6 Exactitud

Se analizaron matrices cargadas con la concentración de 100 µg/mL por sextuplicado.^{23, 24}

5.9.7 Estabilidad

Ciclos de congelado-descongelado

Se analizaron las matrices cargadas con las siguientes concentraciones 20 y 200 µg/mL, cada nivel se realizó por triplicado, posteriormente las muestras se congelaron a -4°C durante 24 horas y se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongeladas las muestras se volvieron a congelar durante 24 horas a -4°C, este ciclo se volvió a repetir y se analizaron las muestras.²³

6. RESULTADOS

6.1 Purificación e identificación de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

En el **Anexo 1** se muestran los espectros de RMN obtenidos de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina utilizada que coinciden con los descritos en la literatura para este compuesto.^{21, 22}

La pureza cromatográfica de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina que se utilizó es del 98%, esto se realizó con el cálculo del porcentaje de área bajo la curva de una muestra del compuesto disuelta con metanol grado HPLC (**Figura 6**) con un punto de fusión entre 101-103 °C (no corregido) que se determinó mediante el aparato Fisher Johns y coincide con lo reportado en la literatura.²²

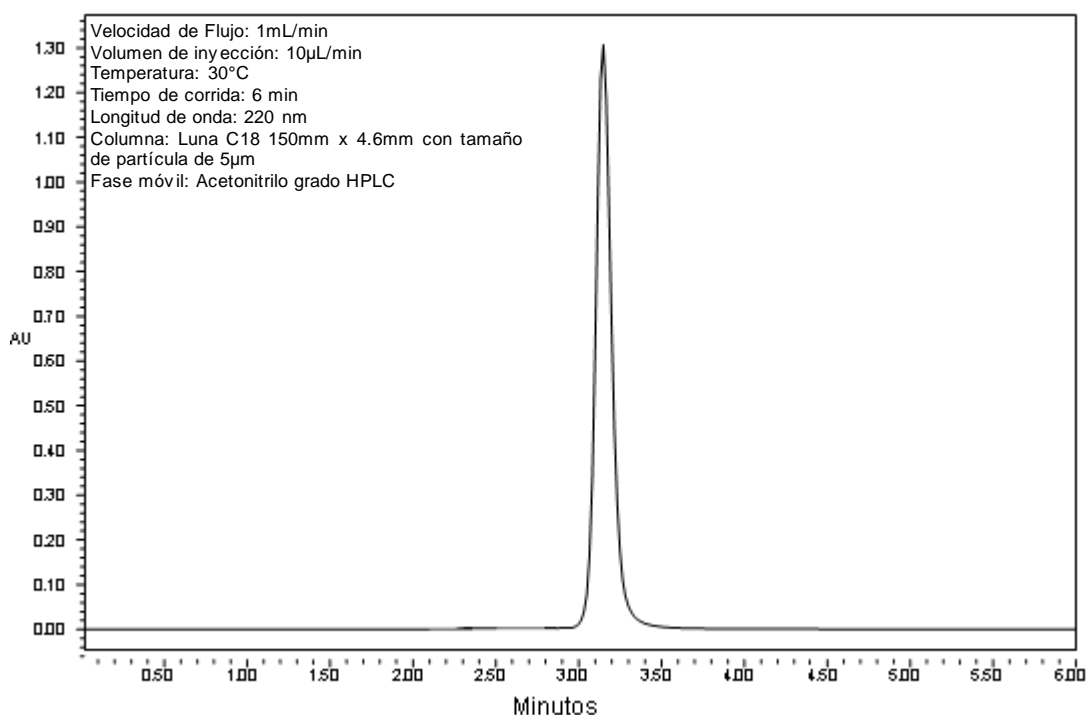


Figura 6. Cromatograma de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (125 μM) en metanol grado HPLC

6.2 Validación del método bioanalítico

Para la validación del método se obtuvo lo siguiente:

6.2.1 Selectividad

En los siguientes cromatogramas (**Figura 7**) se observa como los picos de la matriz y la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina se encuentran bien definidos y separados entre sí.

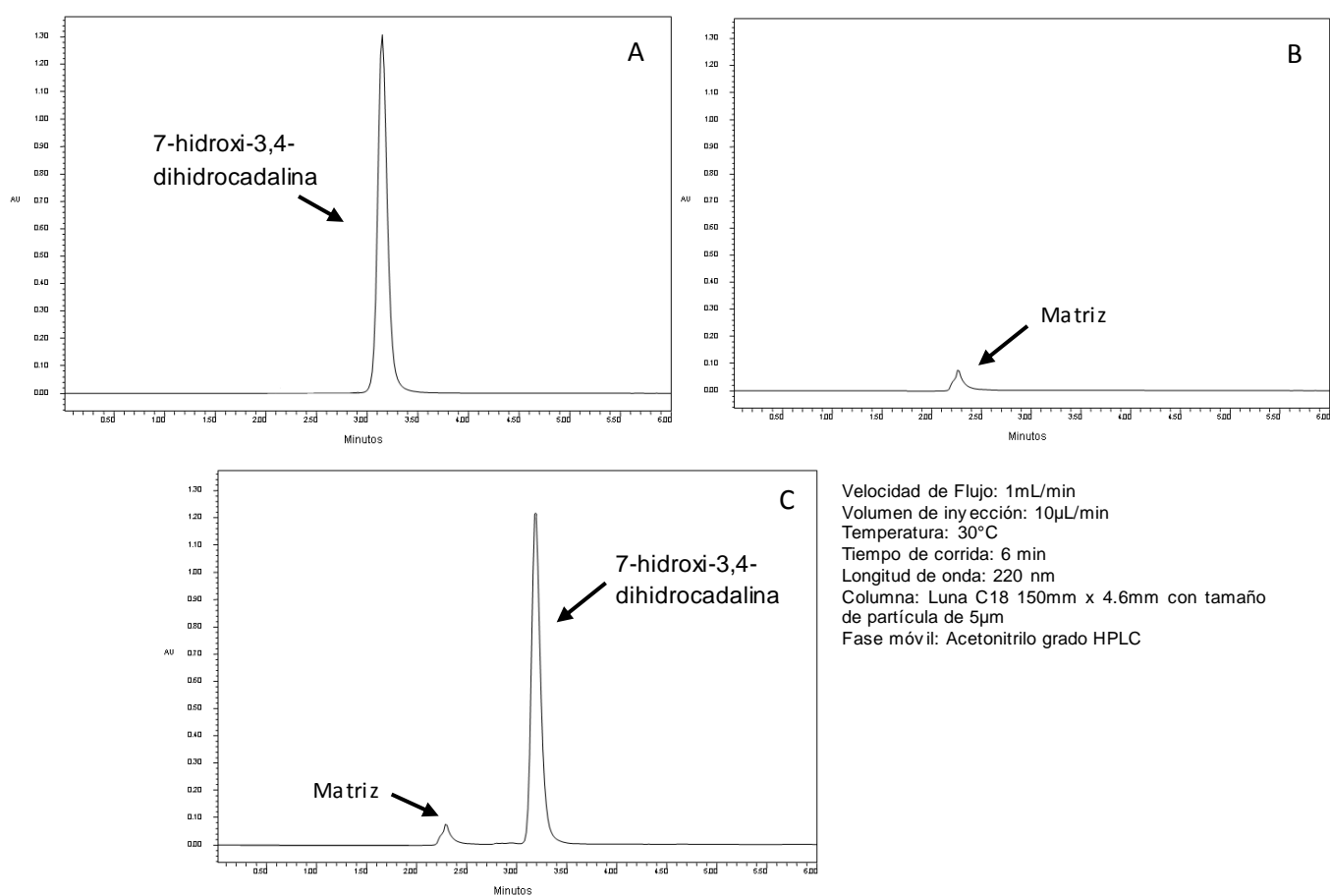


Figura 7. Cromatogramas típicos en donde se muestran los picos correspondientes a la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (A), a la matriz (B) y a la matriz cargada con 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (C) en la concentración de 125 μ M

6.2.2 Linealidad

6.2.2.1 Prueba de homoscedasticidad

Los datos obtenidos para la curva de calibración no pasaron la prueba de homoscedasticidad: F experimental (598.719) comparado con F de tablas (99), por ello, se calculó el factor de peso W_i para cada uno de los modelos de calibración de regresión propuestos por Almeida y colaboradores²⁶ (**Cuadro 3**). De cada modelo se obtuvo la sumatoria del porcentaje del error relativo ($\Sigma\%RE$) para determinar cuál es la curva de calibración más adecuada. Los datos para la realización de esta prueba y los gráficos de residuales vs concentración se pueden observar en el **Anexo 2**.

Modelo	W_i	Ordenada al origen (a)	Pendiente (b)	r^2	$\Sigma\%RE$
1	x^0	389013.60	82817.61	0.994478	0.00000000000000113
2	$1/y^{1/2}$	326526.42	83279.30	0.996287	0.00000000000000069
3	$1/y$	333910.80	83142.14	0.996688	0.00000000000000105
4	$1/y^2$	378169.77	81435.58	0.993842	0.00000000000000145
5	$1/x^{1/2}$	345709.81	83211.72	0.996695	0.00000000000000029
6	$1/x$	366768.42	83025.02	0.997043	0.00000000000000069
7	$1/x^2$	392795.98	81683.27	0.993892	0.00000000000000174

El modelo en el que se obtuvo el menor valor de $\Sigma\%RE$ es el que W_i es igual a $1/x^{1/2}$, por lo tanto, la ecuación obtenida con este factor de peso fue la siguiente:

$$y = 83211.72x + 345709.81$$

Con el modelo anterior se calculó la cantidad recuperada de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en todos los experimentos.

En la **Figura 8** se muestra el gráfico para la linealidad del método

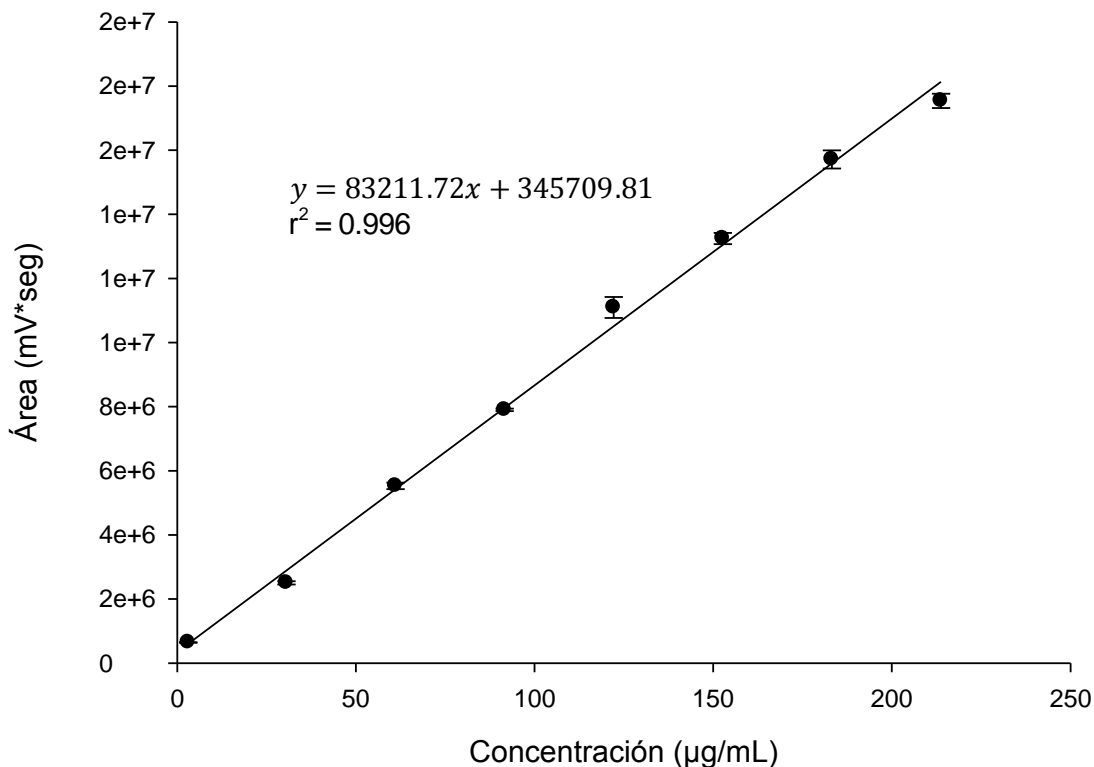


Figura 8. Gráfico de linealidad para la 7- hidroxi-3,4dihidrocajalina, se obtuvo una $b = 345709.81 \pm 7.37 \times 10^{-9}$ y $m = 83211.72 \pm 5.76 \times 10^{-11}$. Se realizó un ANOVA de la regresión lineal, $P < 0.001$. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm EEM

Criterio de aceptación

El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 y el coeficiente de variación menor al 20% en el límite de cuantificación, mientras que en los demás niveles de concentración debe ser menor al 15% (**Anexo 3**), por lo tanto, los resultados para linealidad del método son aceptables para la validación. ^{18,19,21}

El coeficiente de variación en precisión, porcentaje de recobro, exactitud y estabilidad (**Cuadro 4**) resulto ser menor al 15%, por lo tanto, se concluye que este método es capaz de cuantificar a la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en la matriz biológica empleada. En el **Anexo 3** se muestran todos los datos para la validación.

23, 25

Cuadro 4. Datos obtenidos para la validación del método			
Parámetro	Criterio	Resultado	Dictamen
Linealidad	$r^2 > 0.98$	0.996	Se acepta
	$CV \leq 15\%$	3.7 %	Se acepta
Adecuabilidad	(k') $CV \leq 2\%$		
	(t) $CV \leq 2\%$		
Precisión	$CV \leq 15\%$	4.602	Se acepta
Porcentaje de recobro	$CV \leq 15\%$ en los niveles de concentración bajo, medio y alto	3.931% 3.547% 8.585%	Se acepta
Exactitud	$CV \leq 15\%$	3.547%	Se acepta
	IC(μ) 95-105%	95.437 – 102.819%	Se acepta
Estabilidad	$CV \leq 15\%$ al inicio y fin de los ciclos de congelado-descongelado	Inicial 3.931% 8.585%	Se acepta
		Final 11.458% 10.224%	Se acepta

6.3 Permeabilidad *in vitro* de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en diferentes segmentos de intestino.

La permeabilidad intestinal de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina varía según el segmento del intestino, observándose en el yeyuno el mejor perfil cinético, ya que atraviesa la membrana a una menor velocidad. (Figura 9).

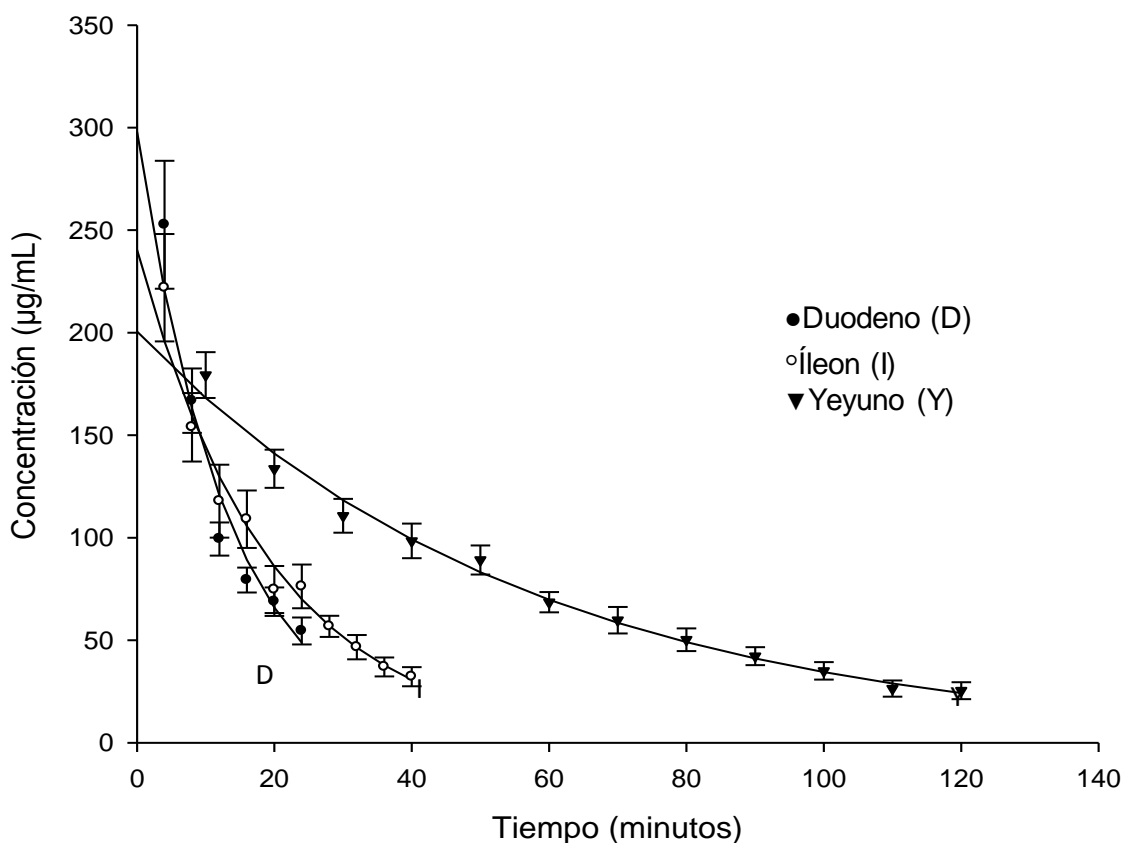


Figura 9. Gráfico de permeabilidad de las concentraciones obtenidas a través del tiempo de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en cada segmento de intestino (concentración de 1.25 mg/mL). Cada punto es el promedio \pm error estándar de la media (EEM) de al menos 10 experimentos.

En los tres segmentos de intestino, la cinética fue de primer orden, Las ecuaciones y las constantes de la ecuación semilogarítmica de Ln C vs t. se presentan en el **Cuadro 5**

Cuadro 5. Ecuaciones de primer orden de cada segmento intestinal			
Segmento de intestino	Ecuación	Coefficiente de determinación (r ²)	Constante K (min ⁻¹)
Duodeno	ln C = -0.0754x + 5.697	0.9497	0.0754 ± 0.0087
Íleon	ln C = -0.0514x + 5.482	0.9839	0.0514 ± 0.0023
Yeyuno	ln C = -0.0176x + 5.301	0.9935	0.0176 ± 0.0004

En general el modelo al cual se ajusta la cinética es el siguiente:

$$A = A_0 e^{-K_a t}$$

donde t es el tiempo transcurrido, A₀ es la concentración inicial y K_a es la velocidad a la cual la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina atraviesa la membrana intestinal.

6.4 Saturación de la permeabilidad

Se determinó la saturación en la permeabilidad a distintas concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (0.625, 1.25 y 2.5 mg/mL en yeyuno), graficándose tiempo vs concentración (**Figura 10**) se obtuvo la ecuación cinética de cada curva (**Cuadro 6**) y las constantes respectivas..

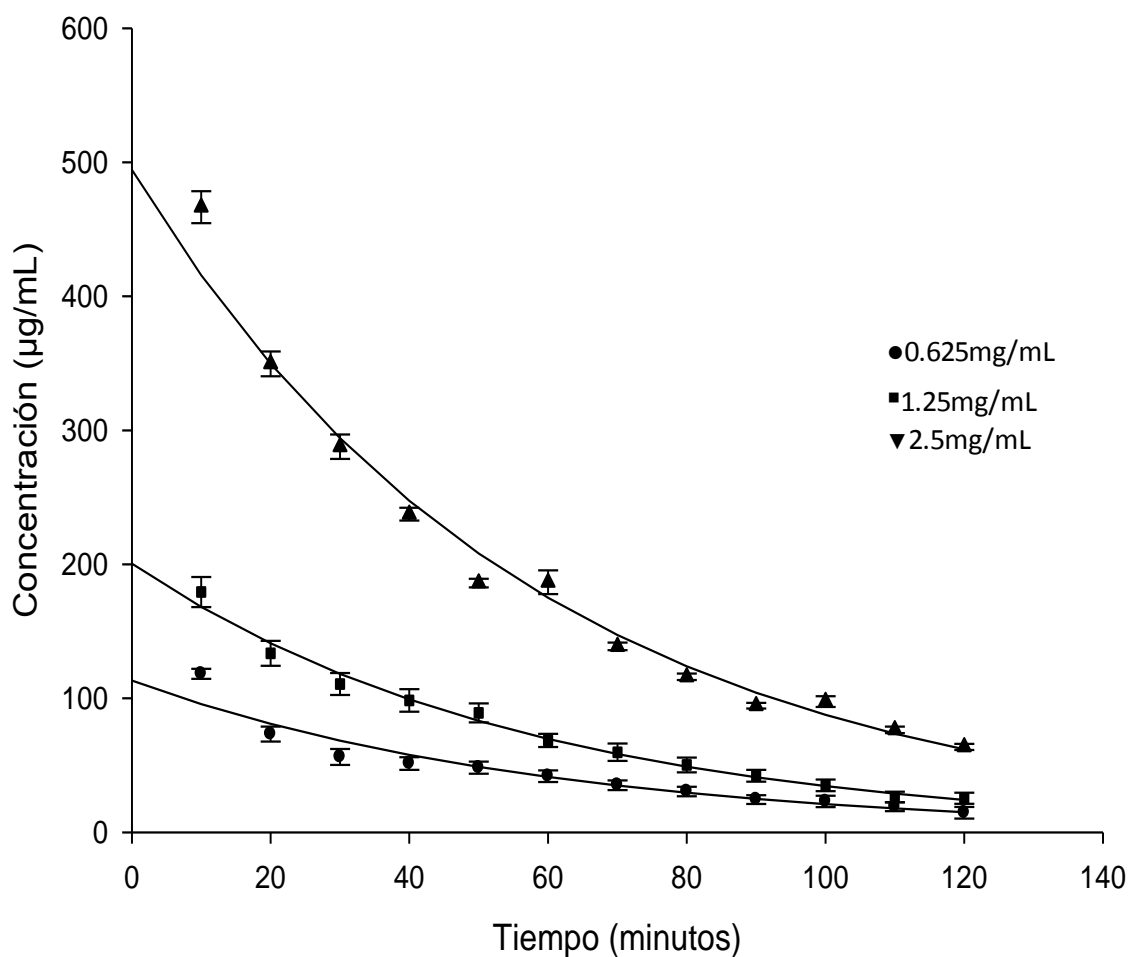


Figura 10. Gráfico de permeabilidad de las distintas concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en yeyuno obtenidas a través del tiempo. Cada punto representa el promedio \pm error estándar de la media (EEM) de al menos 10 experimentos.

Cuadro 6. Ecuaciones de la cinética de primer orden de las diferentes concentraciones en cada segmento de yeyuno			
Concentración	Ecuación	Coefficiente de determinación	Constante K (min ⁻¹)
0.625mg/mL	$\ln C = -0.0168x + 4.7297$	0.9748	0.0168 ± 0.009
1.25mg/mL	$\ln C = -0.0176x + 5.301$	0.9935	0.0176 ± 0.004
2.5mg/mL	$\ln C = -0.0173x + 6.2031$	0.9886	0.0173 ± 0.0004

Del gráfico C vs t se calculó el área bajo la curva por el método de trapezoides para cada concentración. La permeabilidad sigue un comportamiento lineal (r = 0.983) en el rango de concentraciones evaluadas (**Figura 11**).

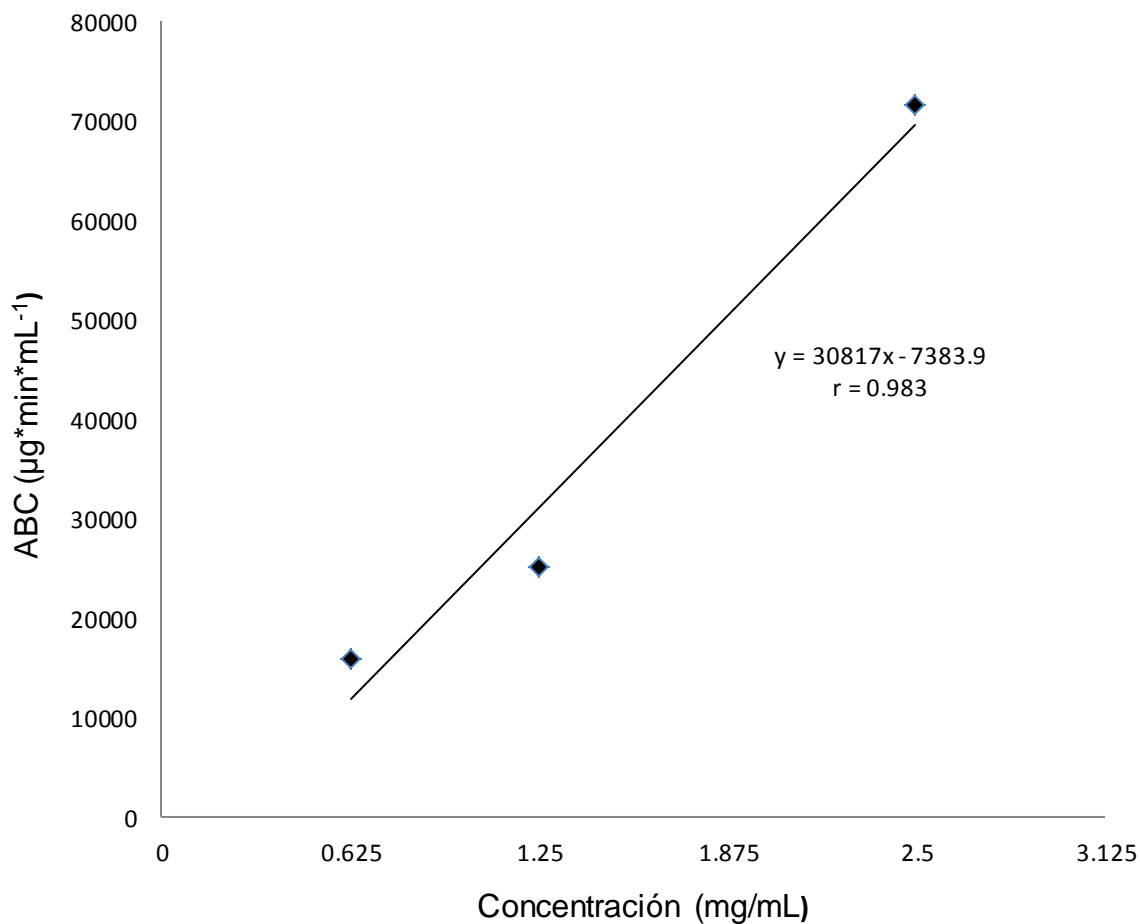


Figura 11. Gráfico del Área bajo la curva (ABC) de las distintas concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina, ecuación de la recta y coeficiente de correlación

6.5 Experimentación con Verapamilo

Para determinar si en la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina interviene la glicoproteína P, se utilizó Verapamilo, como inhibidor de la glicoproteína P. La presencia de verapamilo no modificó la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (**Figura 12**).

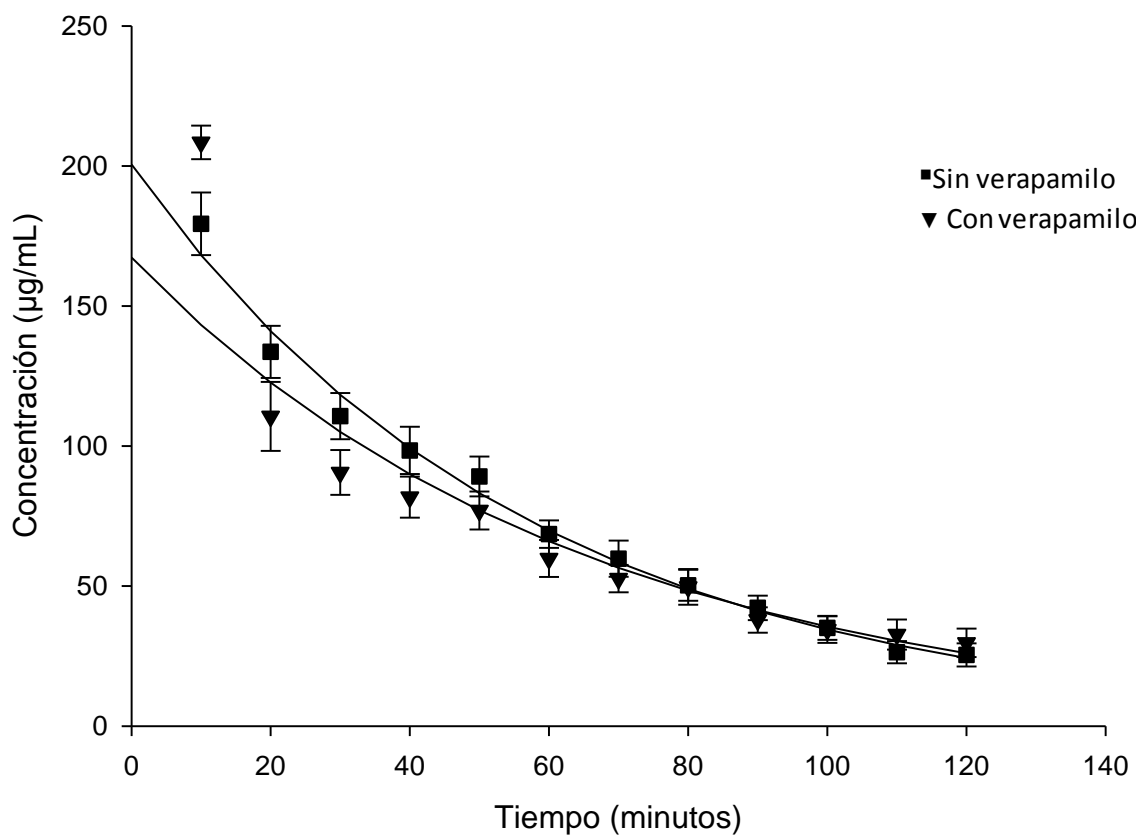


Figura 12. Gráfico de permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en el segmento de yeyuno (concentración de 1.25 mg/mL), en presencia y ausencia de verapamilo. No hay diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$ por la prueba de t no pareada para cada tiempo. Cada punto representa el promedio \pm EEM de 10 experimentos

7. DISCUSIÓN

Se logró determinar la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina en los tres segmentos del intestino (duodeno, yeyuno e íleon), con lo cual se demostró que este compuesto atraviesa la membrana intestinal, por lo que, se sugiere que al administrarla por vía oral se absorberá

Los experimentos se realizaron en intestino de cobayo, debido a que, este modelo permite observar de una mejor manera la cinética de permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina. Inicialmente se hicieron en intestino de rata, sin embargo, la velocidad a la cual atravesó la membrana fue tan rápida que no fue posible determinar el perfil cinético de esta sustancia, por ello, se optó por realizar este estudio en el intestino de cobayo.

En cada segmento de intestino la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es distinta (**Figura 9**), esto puede ser debido a las diferentes características en las vellosidades, (las cuales intervienen en el proceso de absorción de sustancias), el tipo de transportadores, el pH, las uniones estrechas y longitud de cada segmento intestinal.^{4,6}

Las diferencias de la permeabilidad también pueden observarse en el valor de las constantes (**Cuadro 5**), ya que en el duodeno lo hace a una mayor velocidad, seguido de íleon y yeyuno respectivamente. La cinética que mejor se ajusta en los tres casos es de primer orden, debido a que la velocidad en la cual la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina atraviesa la membrana intestinal es dependiente de la concentración. Esto último sugiere que el compuesto no atraviesa la membrana intestinal de forma pasiva.

El mejor perfil cinético para la determinación de la permeabilidad intestinal es en el yeyuno, ya que, hay un mayor tiempo de permeación, por lo tanto, se puede observar de una mejor manera como es que se comporta la 7-hidroxi-3,4

dihidrocajalina. Por tal motivo, para los demás experimentos se utilizó únicamente el yeyuno.

Al realizar el experimento con distintas concentraciones de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina (0.625, 1.25 y 2.5 mg/mL en yeyuno) se determinó que no existe saturación en la permeabilidad ya que, el área bajo la curva que se calculó de cada gráfico de C vs t sigue un comportamiento lineal ($r^2=0.967$), con lo cual se determinó que el transporte de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina es proporcional a la concentración en el lumen intestinal, al menos en el rango de concentraciones evaluado .

En la permeabilidad de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina se observó que no interfiere la glicoproteína P (**Figura 12**) por lo que la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina no sufre de eflujo por esta proteína.

8. CONCLUSIONES

Para este trabajo se concluye que:

- La 7-hidroxi-3,4 dihidroscadalina es permeable a través de la membrana intestinal de cobayo, siguiendo una cinética de primer orden. Se observó el mejor perfil cinético en el yeyuno, en el cual se evaluaron tres diferentes concentraciones verificando que no hubo saturación en el transporte. La permeabilidad de este producto natural no se modificó por la inhibición de la glicoproteína P.
- Se desarrolló y validó el método bionalítico empleado para cuantificar a la 7-hidroxi-3,4-dihidroscadalina en la matriz biológica empleada.

9. PERSPECTIVAS

- Utilizar membranas sintéticas que permitan observar únicamente el transporte pasivo de la 7- hidroxi-3,4 dihidrocajalina, además de realizarlo con cultivos celulares que expresen algún transportador, para comparar esos resultados con los ya obtenidos.
- Al realizar el estudio de absorción *in vivo* en cobayos al administrar a la 7- hidroxi-3,4 dihidrocajalina por vía oral, se podría establecer el tiempo que tarda en llegar a la circulación sanguínea y con establecer si realmente se absorbe este compuesto.

10. REFERENCIAS

1. Argueta A y Gallardo M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 1ª edición. México. 1994.
2. Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T y Kubo I. Inhibition of Lipid Peroxidation by Sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1996; 48(4): 44-443.
3. Rocha H., Blaisdell E., Granados V., Navarrete A. Neuropharmacology and Analgesia: Antinociceptive effect of 7-hydroxy-3, 4-dihydrocajalina isolated from *Heterotheca inuloides*: Role of peripheral 5-HT₁ serotonergic receptors. *European Journal of Pharmacology*. 2010; 649(1):154-160.
4. Herrera D, Hernández E, Espinoza J, Martínez I, Beltrán A y Martínez J. Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2012; 43 (1): 18-32.
5. Sugano K, Kansy M., Artusson P, Avdeef A, Di L, Ecker F, Ficher H. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Drug Discovery*. 2010, 9: 597-617.
6. Praveen V. Saecho C., Richard A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000; 44 (1): 301-312.
7. Hämäläinen M., Karlsson F. Predicting the intestinal absorption potential of hits and leads. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004. 1 (4): 397-405.
8. Barthe L., Woodley J. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1999. 13 (2): 154-168.

9. Lee C. Vrueth R., Smith F. Selection of development candidates based measurements. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997. 23 (1): 47-62.
10. Streubel A., Siepmann J., Bodmeier R. Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6(5):501–508.
11. Colalto C. Herbal interactions on absorption of drugs; Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacological Research*. 2010; 62(3): 207-227.
12. Hunter J., Hirst B. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997. 25: 129-157.
13. Navarro C., González I., Casabó V., Merino V., Bermejo M. Correlación entre modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en estudios de absorción. *Revista de los estudiantes de medicina de la universidad industrial de Santander*. 2008; 21(1):17-31.
14. Zhanga J., Liua D., Huang Y., Gaob Y., Qian S. Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012; 436: 311-317.
15. Leppert P., Fix J. Use of everted intestinal rings for *in vitro* examination of oral absorption potential. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994; 83(7): 976-981.
16. Espiña B., Otero P., Louzao M., Alfonso A., Botana L. 13-Desmethyl spiroside-c and 13, 19-didesmethyl spiroside-c trans-epithelial permeabilities: Human intestinal permeability modeling. *Toxicology*. 2011; 287: 69-75.

17. Gené R., Segura L., Adzet T., Marin E., Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 60 (2): 157-62.
18. Coballase E., Pedraza J., Cárdenas N., Huerta B., García-M., Ramírez A., Sánchez J., Martínez C., Camacho R., Espinosa J. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011; 63(4): 363–370.
19. Haraguchi H, Saito T., Ishikawa H., Sanchez Y., Ogura T., Kubo I., Kubo Y. Antioxidative Constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1997; 5 (5): 865-871.
20. Ricárdez M., Jiménez J., Lagunez L., and Luque de Castro M. Fast Ultrasound-assisted Extraction of Polar (phenols) and Nonpolar (lipids) Fractions in *Heterotheca inuloides* Cass. *Phytochemical Analysis*. 2010; 22: 484-491.
21. Delgado G., Olivares M., Chávez M., Ramírez A., Linares E., Espinosa G. Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca inuloides*. *Journal of Natural Products*. 2001; 64 (7): 861-864.
22. Kubo I, Muroi H., Kubo A., Chaudhuri S., Sánchez Y., Ogura T. Antimicrobial Agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*. 1994. 60: 218-221.
23. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. Validation of Bionalytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005.

24. Vinod P., Kamal K., Shrikant D. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1991; 16 (4):249-255.
25. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. México 2000.
26. Almeida A., Branco C., Falcao A. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography*. 2002. 774: 215-222.
27. Bohlmann F., Zdero Christa. Überdiehhasltsstoffe von *Heterotheca inuloides* Cass. *Chemische Berichte*. 1976, 109: 2021-2025.

11. ANEXOS

Anexo 1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En las **Figuras 13** y **14** se muestran los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrogeno y carbono de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina que presenta señales que coinciden con las descritas en la literatura en el caso de RMN de carbono, en el **Cuadro 7** se muestra la señal de acuerdo a la posición de cada carbono.²⁷

Cuadro 7. Señales para cada carbono de la molécula 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

Posición	¹³ C (ppm)
1	134.7
2	123.8
3	25.8
4	43.5
5	131.0
6	131.2-131.5
7	152.1
8	109.9
9	131.2-131.5
10	120.9
11	19.0
12	30.5
13	20.2
14	21.4
15	15.5

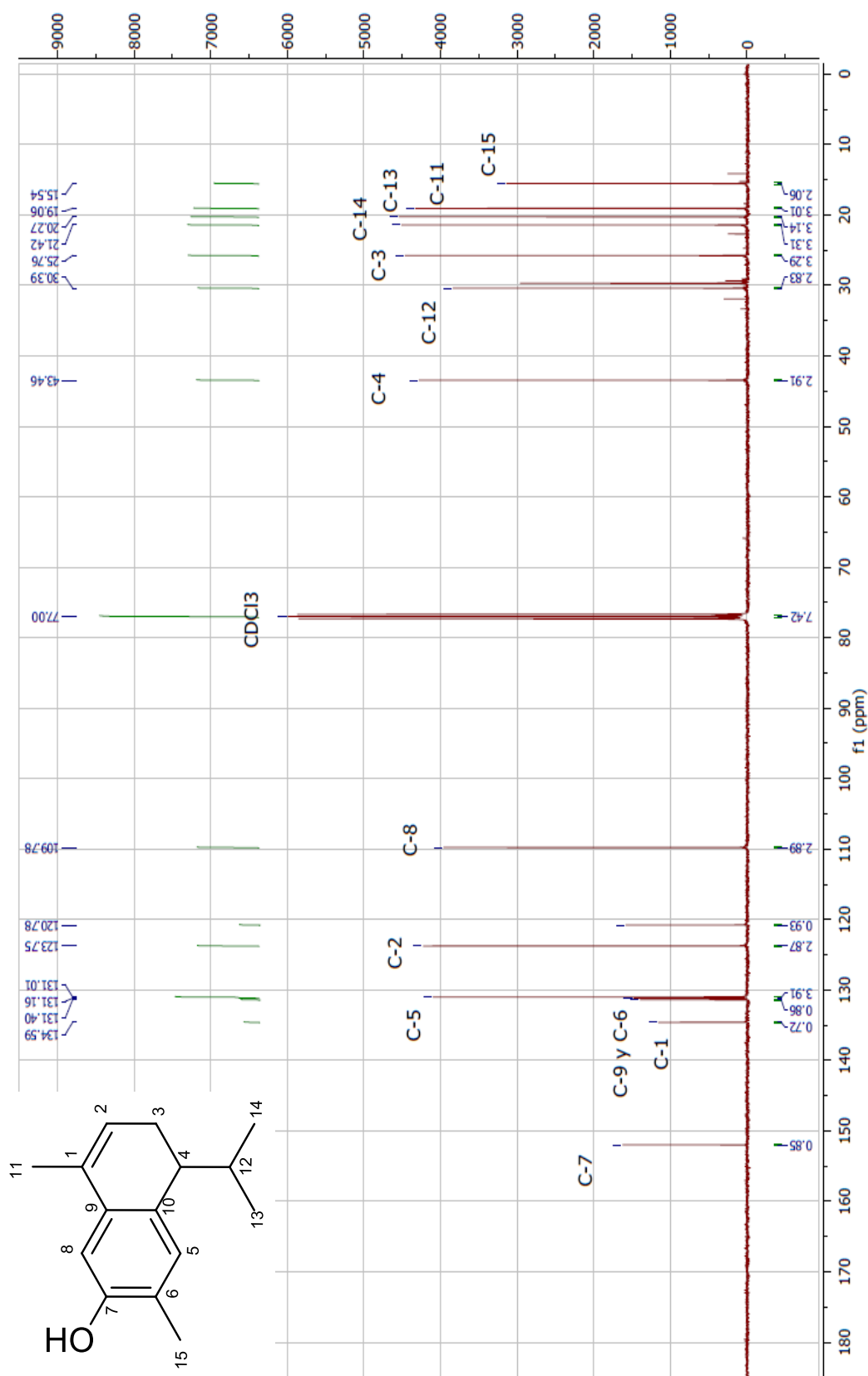


Figura 13. Espectro de RMN de carbono, mostrando picos correspondientes en la molécula

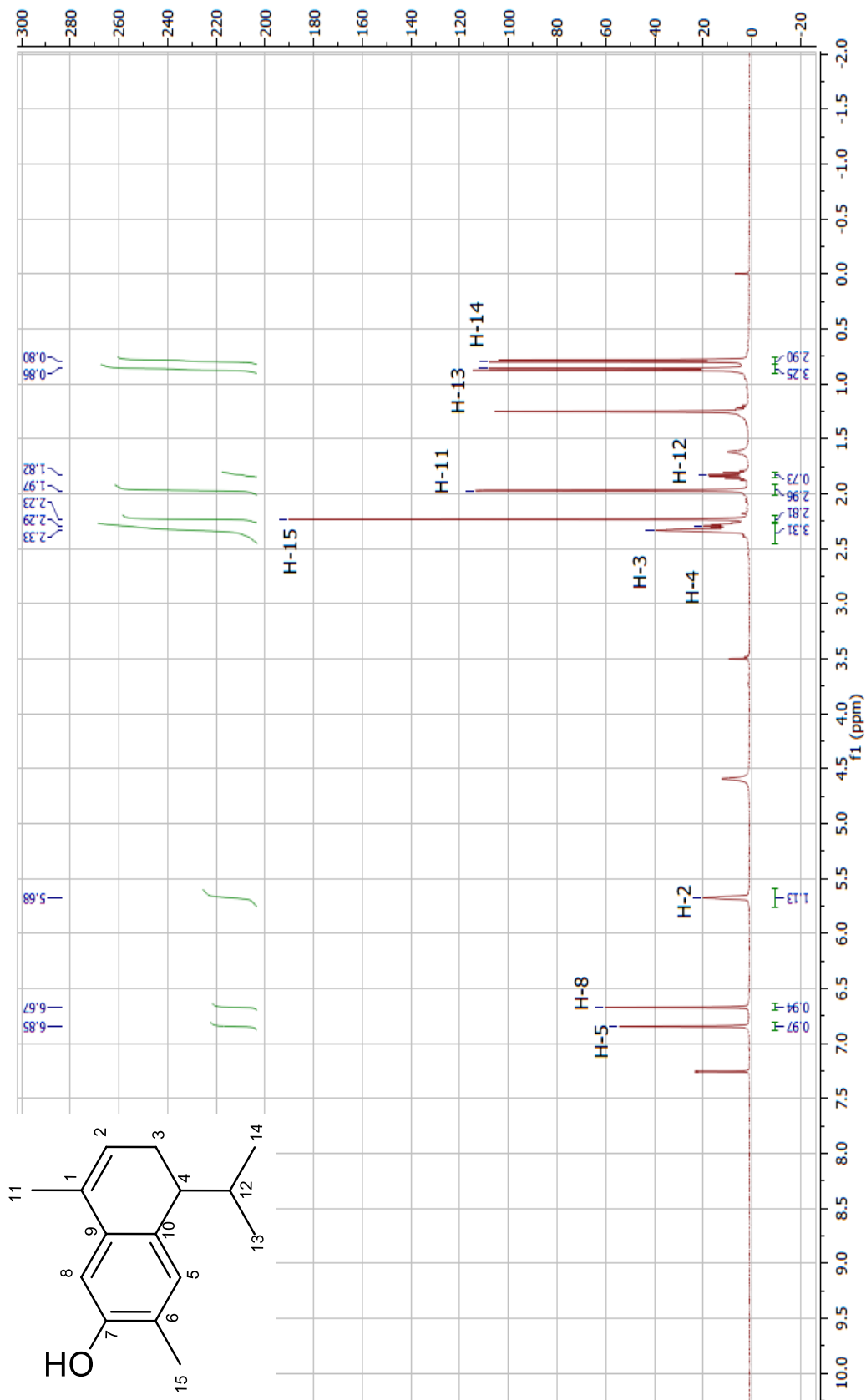


Figura 14 .Espectro de RMN de hidrogeno, mostrando picos correspondientes en la molécula

Anexo 2. Prueba de homoscedasticidad

En el **Cuadro 8** se muestran los modelos propuestos por Almeida y colaboradores, para obtener la mejor curva de calibración.

Cuadro 8. Datos obtenidos de acuerdo a cada modelo para la obtención de la mejor curva de calibración

Conc.(µg/ml) (x)	Area (y)	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5	Modelo 6	Modelo 7
		x^0	$1/y^{1/2}$	$1/y$	$1/y^2$	$1/x^{1/2}$	$1/x$	$1/x^2$
3.0535	627053	1	0.00126	1.595E-06	2.543E-12	0.572	0.327	0.1072517
3.0535	651074	1	0.00124	1.536E-06	2.359E-12	0.572	0.327	0.1072517
3.0535	656873	1	0.00123	1.522E-06	2.318E-12	0.572	0.327	0.1072517
30.535	2427065	1	0.00064	4.120E-07	1.698E-13	0.181	0.033	0.0010725
30.535	2484427	1	0.00063	4.025E-07	1.620E-13	0.181	0.033	0.0010725
30.535	2603119	1	0.00062	3.842E-07	1.476E-13	0.181	0.033	0.0010725
61.07	5329608	1	0.00043	1.876E-07	3.521E-14	0.128	0.016	0.0002681
61.07	5634633	1	0.00042	1.775E-07	3.150E-14	0.128	0.016	0.0002681
61.07	5621464	1	0.00042	1.779E-07	3.164E-14	0.128	0.016	0.0002681
91.605	7859625	1	0.00036	1.272E-07	1.619E-14	0.104	0.011	0.0001192
91.605	7859785	1	0.00036	1.272E-07	1.619E-14	0.104	0.011	0.0001192
91.605	7980795	1	0.00035	1.253E-07	1.570E-14	0.104	0.011	0.0001192
122.14	10884240	1	0.00030	9.188E-08	8.441E-15	0.090	0.008	0.0000670
122.14	10667970	1	0.00031	9.374E-08	8.787E-15	0.090	0.008	0.0000670
122.14	11734254	1	0.00029	8.522E-08	7.263E-15	0.090	0.008	0.0000670
152.675	13599923	1	0.00027	7.353E-08	5.407E-15	0.081	0.007	0.0000429
152.675	13085181	1	0.00028	7.642E-08	5.840E-15	0.081	0.007	0.0000429
152.675	13051671	1	0.00028	7.662E-08	5.870E-15	0.081	0.007	0.0000429
183.21	15226878	1	0.00026	6.567E-08	4.313E-15	0.074	0.005	0.0000298
183.21	16206754	1	0.00025	6.170E-08	3.807E-15	0.074	0.005	0.0000298
183.21	15704459	1	0.00025	6.368E-08	4.055E-15	0.074	0.005	0.0000298
213.745	17188295	1	0.00024	5.818E-08	3.385E-15	0.068	0.005	0.0000219
213.745	17477617	1	0.00024	5.722E-08	3.274E-15	0.068	0.005	0.0000219
213.745	17954422	1	0.00024	5.570E-08	3.102E-15	0.068	0.005	0.0000219

En la **Figura 15** se observa el gráfico de residuales vs concentración para el modelo 5, que fue el que tuvo el menor valor de porcentaje de error relativo (%RE)

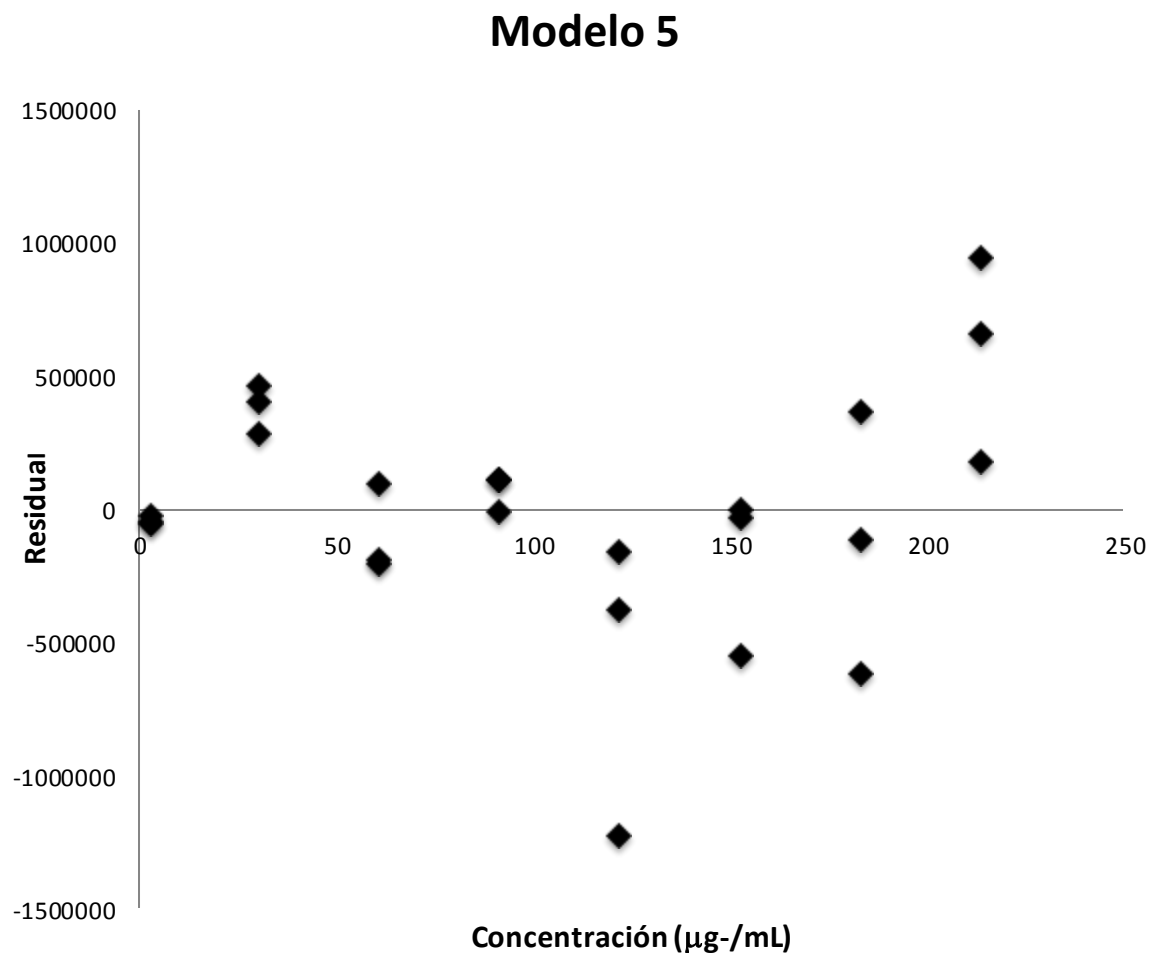


Figura 15. Residuales vs Concentración de la 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina

Anexo 3. Validación del método

En los siguientes cuadros se muestran los datos obtenidos de cada parámetro para la validación del método.

Linealidad

Cuadro 9. Cantidad recuperada de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina promedios y coeficiente de variación por nivel de concentración					
Concentración µg/mL	Áreas	Cantidad recuperada (µg)	Promedio	DE	%CV
3.054	627053	3.381	3.597	0.190	5.283
	651074	3.670			
	656873	3.739			
30.535	2427065	25.013	25.948	1.079	4.159
	2484427	25.702			
	2603119	27.128			
61.070	5329608	59.894	62.285	2.072	3.327
	5634633	63.560			
	5621464	63.402			
91.605	7859625	90.299	90.785	0.840	0.925
	7859785	90.301			
	7980795	91.755			
122.140	10884240	126.647	129.186	6.774	5.243
	10667970	124.048			
	11734254	136.862			
152.675	13599923	159.283	155.025	3.693	2.382
	13085181	153.097			
	13051671	152.694			
183.210	15226878	178.835	184.673	5.888	3.189
	16206754	190.611			
	15704459	184.574			
213.745	17188295	202.406	206.634	4.649	2.250
	17477617	205.883			
	17954422	211.613			

Adecuabilidad

Cuadro 10. Factor de capacidad y factor de asimetría para el método de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina con una concentración correspondiente a 100 µg/ mL y su coeficiente de variación obtenidos directamente del software Empower.

Muestra	Factor de capacidad (k')	Factor de Asimetría (t)
1	0.273643	1.109863
2	0.267376	1.107256
3	0.267235	1.114773
4	0.261481	1.092445
5	0.265983	1.092511
Promedio (Ȳ)	0.2671436	1.1033696
Desviación estándar (S)	0.004350764	0.010302451
Coeficiente de Variación (CV)	1.628623767	0.933726167

Precisión

Cuadro 11. Concentración de las matrices cargadas de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina para determinar precisión del método, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación.					
Cantidad adicionada μg	Área(mV*seg)	Cantidad recuperada (μg)	Promedio μg	DE(Desviación estándar)	% CV
17.7	1784531	17.291	16.912	0.342	2.022
	1732498	16.666			
	1739823	16.754			
	1781816	17.258			
	1714445	16.449			
	1765032	17.057			
97.4	8465030	97.574	95.130	3.335	3.506
	8254968	95.050			
	7855509	90.249			
	8105842	93.258			
	8653788	99.843			
	8234554	94.804			
204.2	14921471	175.165	206.395	17.087	8.279
	17649332	207.947			
	18898705	222.961			
	18005001	212.221			
	18537279	218.618			
	17109303	201.457			
Criterio de aceptación					$\leq 15 \%$
Conclusión					Aceptado

Porcentaje de recobro

Cuadro 12. Concentración de las matrices cargadas de 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina para determinar el porcentaje de recobro del método, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación						
Cantidad adicionada µg/mL	Área (mV*seg)	Cantidad recuperada µg/mL	Porcentaje de recobro	Promedio	DE	% CV
17.5	1812149	17.623	100.703	103.123	4.054	3.931
	1827746	17.810	101.774			
	1870185	18.320	104.688			
	1890819	18.568	106.105			
	1923355	18.959	108.339			
	1760081	16.997	97.127			
99.6	8284779	95.408	95.791	99.526	3.531	3.547
	8863518	102.363	102.774			
	8536716	98.436	98.831			
	8226969	94.713	95.094			
	8908648	102.905	103.319			
	8745204	100.941	101.347			
207.0	19890434	234.879	113.468	103.481	8.884	8.585
	17264567	203.323	98.224			
	20376747	240.724	116.292			
	17266028	203.341	98.232			
	17145876	201.897	97.535			
	17077395	201.074	97.137			
Criterio de aceptación						≤ 15 %
Conclusión						Aceptado

Exactitud

Cuadro 13. Concentración de las matrices cargadas con 7-hidroxi-3,4-dihidrocajalina para determinar la exactitud del método, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación					
Cantidad adicionada (µg)	Área(mV*seg)	Cantidad recuperada (µg)	Promedio µg/mL	DV	% CV
100.1	8284779	95.408	99.128	3.517	3.547
	8863518	102.363			
	8536716	98.436			
	8226969	94.713			
	8908648	102.905			
	8745204	100.941			
Criterio de aceptación					≤ 15 %
Conclusión					Aceptado

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$IC(\mu) = 99.128 \pm (2.571 \frac{3.517}{\sqrt{6}})$$

$$IC(\mu) = 99.128 \pm 3.691$$

$$IC(\mu) = 95.437 - 102.819$$

Estabilidad

Los datos obtenidos al inicio y final de los ciclos de congelado descongelado se muestran en el **Cuadro 14**.

Cuadro 14. Concentración de las muestras antes y después de los ciclos de congelado-descongelado con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación								
Cantidad adicionada (µg)	Área inicial	Cantidad recuperada (inicial) µg	Promedio µg	% CV	Área final	Cantidad final (µg)	Promedio µg	% CV
17.5	1812149	17.623	18.046	3.931	2227888	22.619	25.488	11.458
	1827746	17.810			2328615	23.830		
	1870185	18.320			2215727	22.473		
	1890819	18.568			2667245	27.899		
	1923355	18.959			2568826	26.716		
	1760081	16.997			2791566	29.393		
207	19890434	234.879	214.206	8.585	20601245	243.422	274.797	10.224
	17264567	203.323			19960248	235.718		
	20376747	240.724			24396662	289.033		
	17266028	203.341			24821297	294.136		
	17145876	201.897			23959563	283.780		
	17077395	201.074			25533238	302.692		
Criterio de aceptación				≤ 15 %	Criterio de aceptación			
Conclusión				Aceptado	Conclusión			